


910

EFFETTO DELLO SPIRONOLATTONE E DEL CANRENOATO DI POTASSIO SUI RECETTORI EPATICI CITOSOLICI E NUCLEARI PER GLI ANDROGENI E PER GLI ESTROGENI

A. FRANCAVILLA, A. DI LEO, P.K. EAGON*, L. POLIMENO, F.W. GUGLIELMI,
G. FANIZZA**, M. BARONE, A.M. AQUILINO, G. ZIZZA, T.E. STARZL*

Cattedra di Malattie dell'Apparato Digerente, Università di Bari; *Department of Medicine and
Surgery, University of Pittsburgh; **I Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università di Bari

INTRODUZIONE

I segni di femminilizzazione che compaiono nel corso della cirrosi epatica, quali la ginecomastia, gli spider naevi, l'eritema palmare e l'atrofia testicolare sono dovuti ad alterazioni di tipo endocrino. Alcuni Autori hanno documentato un aumento dei valori plasmatici di estradiolo ed estrone (1), altri hanno riportato un aumento del solo estradiolo libero (2), secondario ad una riduzione della SHBG (sex hormon binding globulin), altri ancora un aumento del rapporto plasmatico estrogeni/testosterone per riduzione dei livelli plasmatici di quest'ultimo (3). È stato dimostrato, inoltre, che i cirrotici maschi con epato-carcinoma presentano un rapporto estrone/testosterone maggiore dei cirrotici senza sovrapposizione neoplastica (4). Si è visto che la comparsa di ginecomastia può verificarsi anche in seguito alla somministrazione di diuretici antialdosteronici che vengono correntemente utilizzati nella terapia dell'ascite nel paziente cirrotico.

Lo spironolattone, più frequentemente del suo metabolita idrosolubile, il canrenoato di potassio, induce la comparsa di segni di femminilizzazione (5).

In considerazione della capacità di questi farmaci di interferire con lo stato ormonale dei soggetti trattati, abbiamo voluto studiare, in animali di laboratorio, l'effetto di questi diuretici sui recettori per gli estrogeni e per gli androgeni del fegato, organo bersaglio e sede del metabolismo degli ormoni steroidei sessuali.

MATERIALI E METODI

Animali

Abbiamo utilizzato per questo studio n. 45 ratti adulti maschi Sprague-Dawley (p.c. 240 g) che abbiamo diviso in tre gruppi. Gli animali del gruppo controllo (gruppo 1) sono stati iniettati per 21 giorni per via peritoneale con 0,5 ml di soluzione fisiologica contenente Tween 80 (0,1% vol/vol).

I ratti degli altri due gruppi hanno ricevuto, disciolti nella stessa soluzione iniettata agli animali di controllo, 5 mg/die di spironolattone (gruppo 2) o di canrenoato di potassio (gruppo 3). Il ventiduesimo giorno gli animali venivano ane-

stetizzati con etere e venivano prelevati dall'aorta addominale 4 cc di sangue per le determinazioni ormonali. Subito dopo, il fegato era perfuso con soluzione fisiologica fredda, rimosso e posto in buffer per la determinazione dei recettori per gli ormoni steroidei sessuali e del MEB (male estrogen binder), proteina citosolica a moderata affinità ed elevata capacità per l'estradiolo, prodotta a livello epatico sotto il controllo degli androgeni.

Metodi

I livelli plasmatici di testosterone, estradiolo, estriolo, DHEAS, progesterone, FSH, LH e PRL sono stati valutati con metodi RIA. I recettori epatici nucleari e citosolici per l'estradiolo e per gli androgeni ed il MEB sono stati dosati con i metodi già da noi precedentemente descritti (6,7).

La concentrazione delle proteine è stata valutata con il metodo di Bradford (8), mentre quella del DNA con il metodo di Burton (9). L'analisi del binding ormonale è stata effettuata con il metodo di Scatchard mentre quella statistica è stata condotta con il t-test di Student.

RISULTATI

Negli animali trattati con spironolattone si è riscontrata una significativa riduzione nei livelli plasmatici di testosterone, mentre tutti gli altri ormoni, gonadici ed ipofisari, hanno presentato valori analoghi a quelli dei controlli. Nei ratti trattati con canrenoato di potassio non c'è stata alcuna variazione nei livelli di estradiolo e di testosterone mentre si è apprezzata una significativa riduzione nei livelli di progesterone e di DHEAS (Tab. 1).

TABELLA 1
Livelli plasmatici ormonali dei ratti controllo e trattati con spironolattone e canrenoato di K

	Controllo	Spironolattone	Canrenoato
Testosterone (ng/ml)	1,8±0,32	0,8±0,24*	1,5±0,30
Estradiolo (pg/ml)	9,8±1,2	7,9±2,1	9,6±1,1
Estriolo (ng/ml)	1,3±0,5	1,7±0,7	1,2±0,4
Progesterone (ng/ml)	3,9±0,3	3,2±0,5	2,7±0,4*
DHEAS (ng/ml)	99,6±22,3	105,0±22,4	38,6±15,3*
FSH (mU/ml)	1,7±0,3	2,5±0,4	1,2±0,2
PRL (mU/ml)	7,0±0,8	6,8±0,3	5,9±0,6
LH (mU/ml)	6,5±1,0	4,8±0,8	4,9±0,9

* $p < 0,05$.

TABELLA 2

Binding specifico del 3H-R1881 in fegato di ratti (fmol/g di fegato)

	Totale	Nucleare	Citosolico
Controlli	364±62	202±46	162±9,9
Spironolattone	170±38*	26±7*	144±24
K-canrenoato	347±61	21±8*	326±42*

* p < 0,05.

TABELLA 3

Attività di una proteina sensibile agli androgeni nel fegato di ratto: MEB
(pmol/mg di proteina)

Controllo	2,41±1
Spironolattone	0
K-canrenoato	6,3±1,5*

* p < 0,05.

I recettori citosolici per gli androgeni (RAc) hanno raggiunto livelli significativamente più alti nei ratti trattati con canrenoato di potassio rispetto agli animali controllo o a quelli trattati con spironolattone. Non si è riscontrata alcuna variazione di affinità dei RAc per i propri leganti in tutti i gruppi studiati. I valori della costante di affinità (Kd) sono stati: 0,26±0,06 nM per il gruppo 1, 0,25±0,08 nM per il gruppo 2 e 0,31±0,04 per il gruppo 3 (Tab. 2).

L'attività dei recettori nucleari per gli androgeni (RAn), comunque, presenta un quadro marcatamente diverso ed è significativamente ridotta negli animali trattati sia con spironolattone che con canrenoato di potassio.

Come risultato di queste variazioni, il contenuto epatico totale di recettori per gli androgeni cambia significativamente solo negli animali trattati con spironolattone (riduzione del 50% rispetto ai livelli normali) e parallelamente si ha una riduzione proporzionale del testosterone plasmatico.

Il MEB (Tab. 3) è assente nel gruppo trattato con spironolattone ed aumenta in maniera statisticamente significativa in quello trattato con canrenoato di potassio.

Quanto si verifica nel fegato di animali trattati con spironolattone, cioè la scomparsa del MEB, avviene anche nei ratti castrati 15 giorni dopo l'intervento.

Abbiamo valutato inoltre, *in vitro*, la possibilità di questi farmaci di interferire con il legame degli androgeni ai propri recettori. Lo spironolattone, a concentrazioni 100 e 1.000 volte superiori, compete debolmente con il 3H-R1881 per

TABELLA 4

Binding specifico del 3H-E2 in fegato di ratti (fmol/g di fegato)

	Totale	Nucleare	Citosolico
Controlli	623±115	178±33	445±61
Spironolattone	549±89	16±12*	533±150
K-canrenoato	650±222	209±44	441±94

* $p < 0,05$.

i recettori citosolici per gli androgeni. Al contrario, il canrenoato di potassio non mostra alcuna competizione.

L'attività dei recettori citosolici per gli estrogeni (REc) (Tab. 4) era virtualmente immodificata tra i tre gruppi, né variava l'affinità dei REc per l'E2 (Kd: gruppo 1 = $0,26 \pm 0,07$ nM, gruppo 2 = $0,45 \pm 0,12$ nM, gruppo 3 = $0,36 \pm 0,08$ nM). I livelli dei recettori nucleari per gli estrogeni erano significativamente ridotti solo nel gruppo di animali trattati con spironolattone. Tuttavia il contenuto epatico totale dei recettori estrogenici così come i livelli plasmatici degli estrogeni non variano nei tre gruppi di animali studiati.

DISCUSSIONE

Il fegato è un organo bersaglio dell'azione degli ormoni steroidei sessuali sia negli animali di sesso maschile che femminile (10). Molti eventi biochimici, in particolare quelli che riguardano il metabolismo di alcuni farmaci e degli ormoni sessuali, dipendono dal sesso dell'animale.

Questo dimorfismo sessuale della funzione epatica è stato osservato sia negli animali di laboratorio che negli uomini (10). Nei ratti di sesso maschile gli androgeni sono implicati nel determinismo del pattern mascolino delle funzioni epatiche stimolando sia l'attività dei recettori androgenici che di certi enzimi e proteine come il MEB deputati alla metabolizzazione degli estrogeni (7). Questo pattern mascolino può essere modificato dalla castrazione dell'animale, dalla somministrazione di estrogeni, dalla legatura parziale della vena porta e dalla rigenerazione epatica.

L'effetto femminilizzante dello spironolattone è stato attribuito a diversi fattori: riduzione della sintesi di testosterone, inibizione del binding del diidrotestosterone, alterazione del rapporto tra testosterone ed estrogeni. I nostri risultati dimostrano che la somministrazione di spironolattone nel ratto maschio provoca un significativo decremento dei livelli plasmatici di testosterone, dei recettori epatici per gli androgeni e la completa perdita della proteina epatica sintetizzata sotto stimolo androgenico (MEB). Malgrado queste profonde modificazioni, i

nostri risultati non dimostrano alcuna azione dello spironolattone sui livelli plasmatici di estradiolo e di estriolo o sull'attività totale dei recettori per gli estrogeni. Queste modificazioni non avvengono sia per il periodo troppo breve di somministrazione che per l'assenza di malattie epatiche nell'animale trattato. I nostri dati confermano, inoltre, i dati clinici di un minor effetto anti-androgenico del canrenoato di potassio (5). Esso, infatti, non comporta alcuna alterazione del testosterone plasmatico e del contenuto totale dei recettori epatici per gli androgeni o del MEB, né altera il pattern estrogenico.

Alla luce dei nostri studi, che hanno dimostrato un ruolo degli ormoni steroidei sessuali e dei rispettivi recettori epatici nei processi proliferativi del fegato, riteniamo necessario compiere ulteriori studi per valutare gli effetti che la somministrazione a lungo termine di antialdosteronici in animali sani e cirrotici ha sui livelli plasmatici degli ormoni steroidei sessuali e dei rispettivi recettori epatici.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Van Thiel D.H., Gavalier J.S., Lester R., Loriaux D.L., Braunstein G.D. - *Plasma estrone, prolactin, neurophysin and sex steroid binding globulin in chronic alcoholic men*. «Metabolism», 24, 1015-1019, 1975.
- (2) Galvao-Teles A., Anderson D.C., Burke G.W., Marshall J.C., Corker C.S., Brown R.L., Clark M.L. - *Biologically active androgen and estradiol in men with chronic liver disease*. «Lancet», 1, 173-177, 1973.
- (3) Kent J.R., Scaramuzzi R.J., Lauwers W., Parlow A.F., Hill M., Penardi R., Hilliard J. - *Plasma testosterone, estradiol and gonadotropins in hepatic insufficiency*. «Gastroenterology», 64, 111-115, 1973.
- (4) Nagasue N., Ogawa W., Yukaya H., Ohta N., Ito A. - *Serum levels of estrogens and testosterone in cirrhotic men with and without hepatocellular carcinoma*. «Gastroenterology», 88, 768-772, 1985.
- (5) Panella C., Laddaga L., Di Leo A., Altieri R., Guglielmi F., Francavilla A. - *La ginecomastia nei cirrotici ascitici dopo trattamento a lungo termine con antialdosteronici*. In corso di stampa su «Le basi razionali della terapia».
- (6) Francavilla A., Eagon P.K., Di Leo A., Van Thiel D.H., Panella C., Polimeno L., Amoruso C., Ingrosso M., Aquilino A.M., Starzl T.E. - *Circadian rhythm of hepatic cytosolic and nuclear estrogen and androgen receptors*. «Gastroenterology», 91, 182-188, 1986.
- (7) Francavilla A., Eagon P.K., Di Leo A., Polimeno L., Panella C., Aquilino A.M., Ingrosso M., Van Thiel D.H., Starzl T.E. - *Sex hormone related functions in regenerating male rat liver*. «Gastroenterology», 91, 1263-1270, 1986.
- (8) Bradford M.M. - *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. «Anal. Biochem.», 72, 248-254, 1976.
- (9) Burton K. - *Determination of DNA concentration with diphenylamine*. «Methods Enzymol.», 12, 163-166, 1968.
- (10) Eagon P.K., Porter L.E., Francavilla A., Di Leo A., Van Thiel D.H. - *Estrogen and androgen receptors in liver: their role in liver disease and regeneration*. «Semin. Liver Dis.», 5, 59-68, 1985.